

DESARROLLO DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ERITROMICINA EN COMPRIMIDOS

Development of a spectrophotometric method for the quantification of erythromycin in tablets

Diana Laura García Alcaraz, Miriam Guadalupe Lugo Castillo, Mario Ulises Morales Urquieta, José David Sánchez Bonilla, Martha Esther Chía Martínez, Marco Antonio Ramírez Morales.¹

¹ Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Farmacia.
ma.ramirez@ugto.mx¹

Resumen

El presente estudio describe el desarrollo y validación de un método espectrofotométrico en el rango UV-Visible, de bajo costo y accesible, para la cuantificación de eritromicina en formulaciones farmacéuticas sólidas (tabletas), proponiéndose como una alternativa analítica al método convencional basado en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el cual demanda equipos sofisticados y personal altamente especializado. La eritromicina, un antibiótico macrólido con actividad bactericida frente a microorganismos Gram positivos y negativos, carece de grupos cromóforos intrínsecos, lo que dificulta su detección directa mediante técnicas espectrofotométricas convencionales. No obstante, la reacción química con ácido sulfúrico conduce a la formación de un complejo coloreado amarillo, cuya máxima absorbancia se observa a 480 nm, habilitando así su cuantificación precisa.

Se construyeron curvas de calibración empleando eritromicina de referencia farmacéutica pura y comparativamente, soluciones preparadas a partir de tabletas comerciales. Las mediciones espectrofotométricas evidenciaron un comportamiento lineal óptimo, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.998. Se identificó la fotosensibilidad del cromóforo formado, lo que motivó la optimización del medio reactivo; se sustituyó el sistema acetato de sodio/ácido clorhídrico por una mezcla acuosa con ácido sulfúrico, mejorando significativamente la estabilidad del complejo coloreado.

Los ensayos cuantitativos demostraron que la curva calibrada a partir de tabletas proporcionaba valores más concordantes con los contenidos nominales, pese a la posible interferencia atribuible a excipientes farmacéuticos. Aunque se registraron limitaciones inherentes, tales como la inestabilidad temporal del producto coloreado y la variabilidad del analista, el método mostró reproducibilidad satisfactoria y un claro potencial como herramienta didáctica. En conclusión, tras la implementación de ajustes adicionales, este enfoque espectrofotométrico representa una alternativa viable, económica y eficiente para la determinación de eritromicina en productos farmacéuticos sólidos.

Palabras clave: eritromicina, método de cuantificación, Ultravioleta-Visible, macrólido.

Introducción

Los estudios de estabilidad de fármacos, medicamentos y remedios herbolarios son la evidencia científica que demuestran el periodo de vida útil asignado a éstos. Dichos estudios, permiten asignar los periodos de caducidad, tiempos de permanencia a granel o productos intermedios almacenados durante el proceso, establecer las condiciones de almacenamiento y transporte, así como seleccionar el mejor sistema contenedor.¹ En los productos farmacéuticos pueden ocurrir, a lo largo del tiempo, procesos irreversibles de naturaleza química, física o microbiológica que afecten la estabilidad del ingrediente farmacéutico activo (IFA) o de los excipientes. La magnitud y velocidad de estos procesos pueden ser consecuencia de las propiedades intrínsecas de la formulación en su envase primario, o de factores externos tales como temperatura, luz, aire o humedad.²

La eritromicina pertenece a la familia de los macrólidos que constituyen una clase muy importante de compuestos antibacterianos altamente activos contra cocos Gram positivos y Gram negativos. Es un fármaco antibacteriano muy eficaz que se utiliza a menudo para el tratamiento de la neumonía, la garganta, la bronquitis y las infecciones del oído, así como las infecciones respiratorias y del tracto urinario.³⁻⁵

Los antibióticos macrólidos contienen un grupo básico de dimetilamina $[-N(CH_3)_2]$, que es capaz de ganar un protón. Su característica principal es un anillo de lactona macrocíclico con uno o dos restos de azúcar. Estructuralmente, la eritromicina (figura 1) es un anillo de lactona de 14 miembros con diez centros asimétricos y dos moléculas de azúcar (L-cladinosa y eritralosamina).

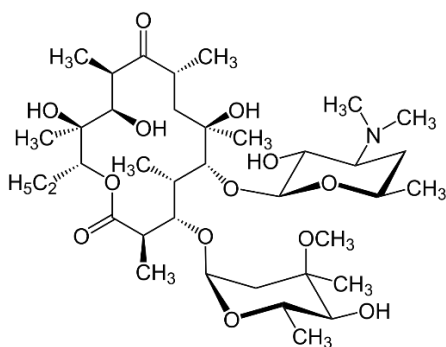


Figura 1. Estructura química de la eritromicina.

La eritromicina es estable en ácido, mostrando una buena actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se metaboliza principalmente a su metabolito biológicamente activo **14-hidroxi-6-O-metil-eritromicina** tanto en animales como en humanos (Figura 2). Puede ser inactivado por la eliminación hidrolítica del resto de azúcar cladinosa, que tiene lugar en condiciones ácidas.⁶

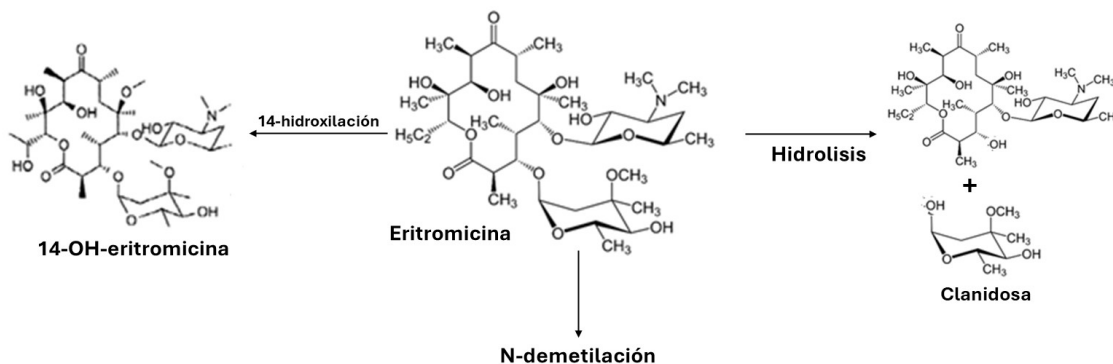


Figura 2. Metabolismo de la eritromicina.

Actualmente se dispone de un método para la cuantificación de la eritromicina en todas sus formas farmacéuticas, está la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que es el utilizado comúnmente, sin embargo, presenta algunas limitaciones al ser el único método, siendo la principal de ella el costo del equipo y personal capacitados para operarlo.⁷⁻⁸

Los antibióticos macrólidos no poseen suficientes grupos cromóforos, lo que impide su determinación directa mediante espectrofotómetro,⁹ la eritromicina reacciona con H_2SO_4 concentrado, lo que le da un color amarillo, ya que la fracción de azúcar de la eritromicina reacciona con el ácido sulfúrico y muestra una absorbancia máxima a 480 nm.¹⁰

Es por ello por lo que en el presente trabajo se propone un estudio de cuantificación sencillo y de bajo costo, para la determinación de concentración de un antibiótico macrólido en este caso la eritromicina, basado en la en una reacción de hidrólisis del principio activo, para la eliminación hidrolítica de la fracción de azúcar cladinosa (figura 2) los cuales forman una coloración amarillo pálido que absorbe en la zona visible del espectro.

Los resultados de la investigación facilitaran el proceso de difusión del conocimiento por los canales comunes como congresos, artículos científicos y presentaciones, tanto en foros dentro y fuera de la universidad.

Objetivos

- Desarrollar un método espectroscópico por Ultravioleta-visible para determinar la presencia de la eritromicina.

- Facilitar a los alumnos participantes la comprensión de los principios básicos para la determinación de un metabolito por espectroscopia Ultravioleta-visible.

Metodología

Colección de la muestra

Para este estudio se utilizó una marca comercial de medicamento genérico “Latotryd” en tabletas de eritromicina con una concentración de 500 mg, del laboratorio atlantis S.A. de C. V.

Reactivos

Se prepararon soluciones de ácido clorhídrico 0.1 M, de acetato de sodio trihidratado 0.1 M. El ácido sulfúrico concentrado se consiguió de una marca comercial.

Instrumentación

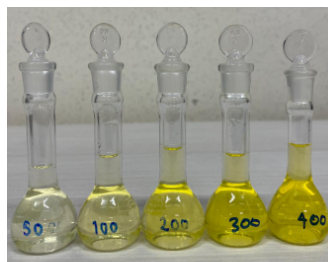
Se usó un espectrofotómetro UV-Vis de la marca Thermo Fisher. La detección UV fue acoplada a una longitud de onda de 480 nm para detectar los picos de las muestras.

Preparación de la curva de calibración

Se preparó una solución madre con eritromicina pura de la marca comercial Sigma-Aldrich. Se pesaron 50 miligramos de eritromicina, inmediatamente se mezcló con 50 ml de solución de acetato de sodio trihidratado 0.1 M, se sonico para mejorar la disolución del reactivo, se agregaron 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y la solución resultante se filtró. Finalmente se aforó con ácido clorhídrico 0.1 M en un matraz de 100 ml. Posteriormente, se procedieron a realizar las diluciones en cinco matraces volumétricos de 10 ml siguiendo la Tabla 1 utilizando la solución anteriormente obtenida y aforando con HCl 0.1 M.

Tabla 1. Concentración de diluciones realizadas para la curva de calibración

Concentración	ml de la solución madre
50 µg/ml	1 ml
100 µg/ml	2 ml
200 µg/ml	4 ml
300 µg/ml	6 ml
400 µg/ml	8 ml



Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 480 nm, y se obtuvo la ecuación de la recta.

Preparación de muestra

Se preparo la muestra triturando una tableta y disolviéndola en de agua purificada. Se agito hasta disolverla y se llevó a sonicación por 10 minutos. Posteriormente se tomó 1ml de la solución ya preparada y se depositó en un matraz aforado de 100 ml en donde se le añadieron 50 ml de solución de acetato de sodio y se llevó a sonicación por 10 minutos más. Se añadieron 10 ml de ácido sulfúrico concentrado. Este paso es crítico, puesto que se debe añadir rápidamente y esperar a que se genere un color amarillo (figura 3). Una vez se observó el color deseado se filtró la solución y se aforó hasta 100 ml con una solución de ácido clorhídrico 0.1 M. Se añadiendo 4 ml de la solución obtenida en un matraz aforado de 10 ml y llevándolo al aforo con ácido clorhídrico 0.1 M para obtener una concentración de 200mg/ml. Las diluciones se realizaron por triplicado (figura 3) y se llevaron a leer en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 480 nm. Y se replicó durante los siguientes días.

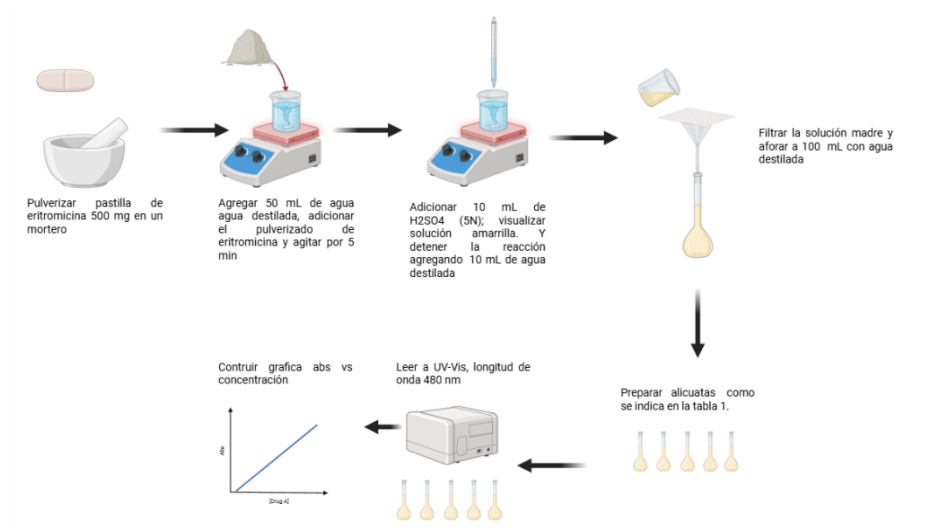
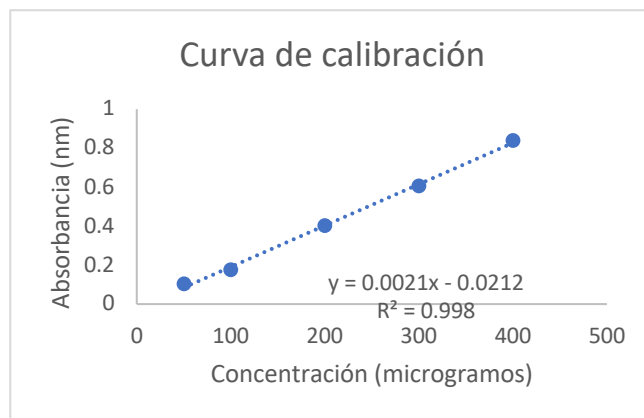


Figura 3. Preparación de la muestra y diluciones

Discusión de Resultados

Se realizó una curva de calibración con el estándar de eritromicina empleando las diferentes diluciones para realizar una gráfica (gráfica 1) donde se observa como la absorbancia es directamente proporcional a su concentración (tabla 1). Se observa un R^2 de 0.998 que nos deja ver la linealidad de las concentraciones.



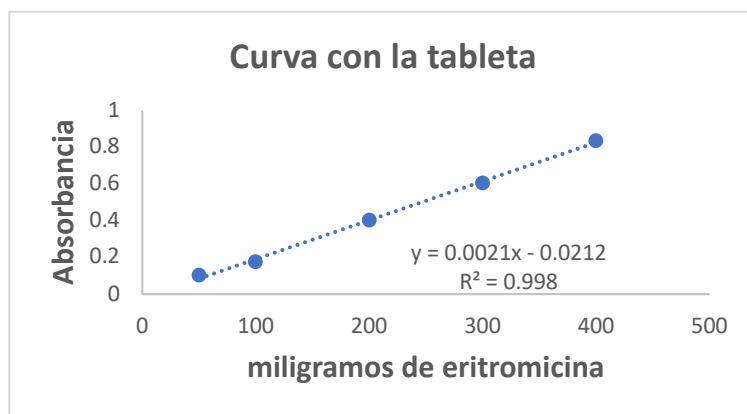
Grafica 1. Curva de calibración del estándar de eritromicina.

Posteriormente se planteó realizar la lectura al siguiente día, para ver la estabilidad del método, sin embargo, se observó que la solución cambió de color de amarillo a verde lo cual nos muestra que la reacción no es estable.

Así que se repitió todo el procedimiento y esta vez se guardó la muestra oculta de la luz, observando que el color amarillo se mantiene durante 3 días. Esto nos indica que el producto de la degradación es fotosensible.

Así que se pensó que tal vez simplificando el medio de reacción podría mejorar la estabilidad del método y se realizó la misma prueba con agua y ácido sulfúrico, dando lugar a la coloración amarilla, la cual se mantiene más estable que si se usara el acetato de sodio y el ácido clorhídrico como medio de reacción. Por lo cual se decidió mantener como medio agua y ácido sulfúrico. Se realizó un barrido de la muestra para ver si se genera la señal de la degradación de la eritromicina la cual aparece en la longitud de 480nm.

Posteriormente se procesó la tableta y con ella se realizó una curva de calibración para que los alumnos pudieran realizar cada uno su propia curva y ver la reproducibilidad al cambiar el analista. La cual demostró que el proceso es reproducible y con una buena linealidad, obteniéndose la ecuación de la recta y el valor de R^2 (gráfica2).



Gráfica2. Datos de la curva de calibración usando la tableta como fuente de eritromicina.

Una vez que se observó que las condiciones de hidrólisis pueden ser reproducibles, se realizó la cuantificación con ambas curvas con el estándar de referencia y con la realizada con el medicamento, tomando una tableta la cual se procesó a una concentración de 200 μg y se midió la absorbancia (tabla2)

Tabla 2. Valores de las muestras con las diferentes curvas de calibración.

Absorbancia curva con estándar de referencia	Valor en microgramos	Absorbancia curva con tableta	Valor en microgramos
0.7287	144.73	0.7569	311.67
0.5034	99.96	0.5604	230.76
0.5805	115.30	0.5985	246.45
Promedio	120	Promedio	262.96

De las pruebas de cuantificación se observó que la curva realizada con la tableta tiene un valor más cercano al esperado, mientras que el valor con la sustancia de referencia tiene una desviación mayor. Las desviaciones se pueden explicar, si se toma en cuenta que la hidrólisis no fue completa al usar la sustancia de referencia lo cual generó valores inferiores a lo esperado y la sobre estimación se da cuando se usa la tableta posiblemente debido a interferencia con el excipiente o una mala filtración

Conclusión

La implementación de esta técnica permitió la generación de una experiencia educativa orientada a facilitar la comprensión por parte de los estudiantes sobre la relevancia de la cuantificación de los principios activos en medicamentos, elemento fundamental en el desarrollo farmacéutico. Así mismo, se promovió la exploración de metodologías analíticas novedosas, aún no reportadas en la literatura, evaluando su aplicabilidad y eficacia.

Durante la ejecución experimental, se identificaron diversas limitaciones del método en desarrollo, tales como la inestabilidad del analito o complejo formado, dificultades en la determinación del punto final de la reacción de hidrólisis, y una precisión sub-óptima en los resultados obtenidos. No obstante, los datos cuantitativos evidenciaron una aproximación adecuada a los valores teóricos, presentando una desviación mínima entre los métodos comparados, sugiriendo que la variabilidad pudiera atribuirse principalmente a la falta de experiencia operativa del analista.

En consecuencia, se infiere que, con una optimización temporal y técnica adicional, el método puede ser perfeccionado. Su bajo costo y simplicidad operacional lo posicionan como una estrategia prometedora para aplicaciones rutinarias. Se concluye que la técnica espectrofotométrica en el rango UV constituye un método alternativo eficaz y económicamente viable para la determinación cuantitativa de eritromicina en formulaciones farmacéuticas, en comparación con los métodos convencionales.

Bibliografía

1. Secretaría de Gobierno. (2015). *NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios*. Diario Oficial de la Federación. Recuperado de: https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5440183
2. Zilker, M., Sörgel, F. & Holzgrabe, U. (2019). A systematic review of the stability of finished pharmaceutical products and drug substances beyond their labeled expiry dates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.016>
3. Erythromycin: MedlinePlus Drug Information. <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682381.html>.
4. Etiqueta: ERYGEL- gel de eritromicina. <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=f1c6885e-4136-4542-a8a2-7fa8fcd77a03> (2018).
5. Etiqueta: ESTEARATO DE ERITROCINA - comprimido de estearato de eritromicina, recubierto con película. <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=8aa50166-8f4f-4389-8354-c558c20e63b6> (2015).
6. Hewala, I. I., & Afifi, S.A. (2011). Development and validation of stability-indicating UV-spectrophotometric and RP-HPLC methods for the determination of claritromycin in bulk powder and pharmaceutical formulations, *Journal of AOAC international*, 94(1), 185-192. DOI: [10.13171/mjc64/01706211420-tzouganaki](https://doi.org/10.13171/mjc64/01706211420-tzouganaki)
7. García-Mayor, M. A. *et al.* Occurrence of erythromycin residues in sheep milk. Validation of an analytical method. *Food and Chemical Toxicology* **78**, 26–32 (2015).
8. Wang, Z. *et al.* Hapten synthesis, monoclonal antibody production and development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for erythromycin in milk. *Food Chem* **171**, 98–107 (2015).
9. Rattanapoltaveechai, R., Vongkom, W., Suntornsuk, W., & Suntornsuk, L. (2007). *Simple and Rapid Spectrophotometric Method for the Analysis of Erythromycin in Pharmaceutical Dosage Forms*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15(1). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.243710>
10. Tan, J., Chu, J., Hao, Y., Wang, Y., Yao, S., Zhuang, Y., & Zhang, S. (2013). A high-throughput screening strategy for accurate quantification of erythromycin. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(4), 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.12.024>
11. Deokate, U. A., Ahire, S., & Lahane-Ahire, S. (2020). Available Analytical Method for Macrolide Antibiotic. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 26(2), 256–261. https://www.researchgate.net/publication/338335818_Available_Analytical_Method_for_Macrolide_Antibiotic
12. Wankhade, R., Bhalerao, S., Panchory, H., Pundir, A., & Pradhan, R. (2012). Analysis of Erythromycin and Benzoyl Peroxide in Combined Dosage Form by UV-Visible Spectrophotometry. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(4), 527–531. https://web.archive.org/web/20180413020302id_/http://ijppsjournal.com/Vol4Suppl4/4612.pdf